

Pengembangan Set Multipleks Penanda DNA Mikrosatelit untuk Analisis Variasi Genetik Padi dan Kedelai

Chaerani, Nurul Hidayatun, dan Dwinita W. Utami

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Development of Multiplex Sets of Microsatellite DNA Markers for Analysis of Genetic Diversity in Rice and Soybean. Chaerani, Nurul Hidayatun, and Dwinita W. Utami. Detection of multiplex microsatellite markers in a single capillary array on a laser detection system is traditionally conducted with specific primers that are labelled with fluorescent dyes. An alternative method using fluorescent labels that are appended to 5' end of universal primer M13 instead of to the specific primers offers flexibility in designing multiplex panels and a less expensive method. Allele size range of microsatellite loci that can be grouped in multiplex panels can be accurately estimated by pooling and analyzing DNA samples from several genotypes simultaneously. This paper describes the procedure in development of microsatellite multiplex panels using M13 fluorescently-labelled and estimation of allele size range based on pooled DNA strategies. Two multiplex panels of PCR amplification products for rice consisting of 15 loci and three panels for soybean consisting of 10 loci have been designed. The panels have been applied to 50 accessions of rice and soybean with fairly good results. Further characterization of allele size range, however, is required prior to the application of these panels to diverse genotypes. The procedure described here should be applicable in the development of multiplex panels of other species.

Key words: Microsatellite markers, multiplex panels, fluorescently labelled M13 primer, rice, soybean.

PENDAHULUAN

Mikrosatelit, atau juga dikenal sebagai SSR (*simple sequence repeat*), adalah utasan DNA yang terdiri atas beberapa kali pengulangan basa sepanjang 1 sampai 8 pasang (Bredemeijer *et al.* 1998, Narvel *et al.* 2000). Daerah pengapit sebuah mikrosatelit biasanya terkonservasi pada individu-individu dalam spesies yang sama sehingga dimungkinkan untuk merancang primer yang komplementer dengan daerah pengapit ini untuk amplifikasi mikrosatelit dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Variasi dalam jumlah pengulangan basa terlihat sebagai produk PCR yang berbeda panjangnya dan dikenal sebagai polimorfisme. Daerah yang teramplifikasi oleh primer dinyatakan sebagai lokus dan variasi panjang produk PCR sebagai alel (Narvel *et al.* 2000).

Metode-metode yang digunakan untuk mendeteksi produk PCR mikrosatelit adalah elektroforesis pada gel poliakrilamid terdenaturasi, gel agarose, dan menggunakan mesin *genetic analyzer* berbasis sistem deteksi laser yang otomatis. Deteksi fragmen mikrosatelit pada *genetic analyzer* memerlukan pelabelan salah satu dari sepasang primer pada ujung 5' dengan salah satu dari tiga warna fluoresen (Diwan dan Cregan 1997, Bredemeijer *et al.* 1998, Narvel *et al.* 2000). Amplifikasi PCR dengan primer berlabel fluoresen menghasilkan sejumlah kopi alel yang semuanya berlabel warna pada salah satu ujungnya. Label warna mengeluarkan emisi fluoresen pada panjang gelombang tertentu yang kemudian dideteksi oleh *genetic analyzer* berdasarkan sinar laser yang ditembakkannya. Informasi panjang gelombang disimpan dan dianalisis oleh piranti lunak yang kemudian diterjemahkan sebagai puncak-puncak grafik (elektroforegram). Ukuran-ukuran alel ditentukan secara otomatis berdasarkan DNA ukuran standar yang membawa label warna fluoresen keempat dan ditambahkan ke dalam sampel. Kelebihan metode deteksi dengan *genetic analyzer* dibandingkan dengan metode analisis elektroforesis gel manual antara lain (1) set panel multipleks terdiri dari paling sedikit tiga primer mikrosatelit pembawa tiga label warna fluoresen yang berbeda dapat dianalisis secara bersamaan dalam satu kali proses menggunakan satu kapiler *array*, (2) perbedaan ukuran alel dapat terdeteksi hingga 1 pasang basa (pb), dan (3) efisiensi dalam pengerjaannya karena tidak memerlukan pemrosesan gel lebih lanjut (Diwan dan Cregan 1997). Jumlah mikrosatelit dalam satu panel multipleks dapat ditambah jika kisaran ukuran alel masing-masing mikrosatelit terkarakterisasi dengan baik. Mitchell *et al.* (1997) misalnya, berhasil merancang satu panel multipleks terdiri dari 11 mikrosatelit untuk analisis *Brassica* sp. dan Narvel *et al.* (2000) mengembangkan 11 panel terdiri dari 74 mikrosatelit kedelai dengan kisaran 6-8 mikrosatelit per panel. Dengan cara ini analisis genom dengan penanda mikrosatelit menggunakan mesin *genetic analyzer* dapat dilakukan dengan cepat.

Kecepatan analisis dan akurasi yang ditawarkan sistem deteksi laser dikompensasi dengan harga label fluoresen sangat tinggi. Primer berlabel fluoresen ber-

harga enam kali lebih mahal dibandingkan dengan yang tidak berlabel. Biaya analisis mikrosatelit akan mahal jika sejumlah besar primer harus diuji polimorfismenya untuk studi keragaman genetik ataupun untuk pembuatan peta penanda mikrosatelit berkerapatan tinggi; padahal setelah itu sebagian primer mungkin saja tidak terpakai lagi. Schuelke (2000) menawarkan satu alternatif untuk mengatasinya. Dalam reaksi amplifikasi digunakan primer ketiga di samping primer *forward* dan *reverse*, yaitu primer universal M13. Primer M13 dilabel fluoresen pada ujung 5' sedangkan primer *forward* tidak dilabel namun utasannya dipasangkan dengan tambahan utasan primer universal M13 pada ujung 5'. Protokol ini telah digunakan untuk analisis pewarisan penyakit pada manusia dan memberikan hasil sama dengan sistem primer spesifik berlabel.

Tujuan penelitian ini adalah untuk merancang set panel produk amplifikasi PCR untuk dianalisis secara multiplex pada *genetic analyzer* dengan menggunakan primer M13 berlabel fluoresen.

BAHAN DAN METODE

Isolasi DNA

DNA padi dan kedelai diisolasi dalam skala miniprep dari daun-daun muda dari 10 tanaman yang berumur 4-6 minggu. DNA padi diisolasi dengan bufer ekstraksi *sodium dodecyl sulfate* (SDS) mengikuti prosedur dari Lab. McCouch (Laboratorium Terpadu Litbang 2006), sedangkan DNA kedelai dengan bufer ekstraksi *hexadecyltrimethylammonium bromide* (CTAB) sesuai prosedur dari Lab. Doyle (Septiningsih *et al.* 2004). DNA dilarutkan dalam bufer TE (pH 8,0). Kualitas dan kuantitasnya diperiksa pada gel agarosa 0,8-1% setelah direndam dalam larutan ethidium bromida dan divisualisasi dengan alat ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Primer Mikrosatelit dan Primer Universal Berlabel

Lima belas pasang primer mikrosatelit padi dan 10 pasang untuk kedelai dipilih yang terpetakan pada lokus tunggal sehingga variasi panjang mikrosatelit dapat dianggap sebagai alel (Tabel 1). Satu atau dua lokus mikrosatelit mewakili tiap kromosom padi. Sedangkan ke-10 lokus mikrosatelit kedelai mewakili

Tabel 1. Rancangan set panel multiplex produk amplifikasi mikrosatelit DNA padi dan kedelai.

| Komoditas | Panel multiplex | Primer* | Label fluoresen | Warna | Kisaran ukuran alel (pb) |
|-----------|-----------------|---------|-----------------|-------|--------------------------|
| Padi | 1 | RM17 | D2 | Hitam | 178-206 |
| | | RM182 | D2 | Hitam | 159-397 |
| | | RM401 | D2 | Hitam | 239-288 |
| | | RM223 | D3 | Hijau | 162-178 |
| | | RM38 | D3 | Hijau | 216-265 |
| | | RM596 | D4 | Biru | 123-205 |
| | | RM111 | D4 | Biru | 135-157 |
| | 2 | RM317 | D2 | Hitam | 141-172 |
| | | RM475 | D2 | Hitam | 199-220 |
| | | RM517 | D3 | Hijau | 232-291 |
| | | RM209 | D3 | Hijau | 144-172 |
| | | RM328 | D3 | Hijau | 199-206 |
| | | RM261 | D4 | Biru | 141-154 |
| | | RM463 | D4 | Biru | 175-214 |
| | | RM414 | D4 | Biru | 232-233 |
| Kedelai | 1 | Satt142 | D2 | Hitam | 165-170 |
| | | Sct026 | D3 | Hijau | 131-136 |
| | | Satt143 | D3 | Hijau | 209-290 |
| | | Satt002 | D4 | Biru | 132-164 |
| | 2 | Satt005 | D2 | Hitam | 147-209 |
| | | Satt063 | D3 | Hijau | 122-194 |
| | | Sct028 | D4 | Biru | 147-249 |
| | 3 | Satt042 | D2 | Hitam | 145-191 |
| | | Satt263 | D3 | Hijau | 228-235 |
| | | Satt571 | D4 | Biru | 124-160 |

*Utas primer padi dapat dilihat dalam <http://www.gramene.org/resources> dan untuk kedelai dalam <http://soybean.org/resources/ssr.php>.

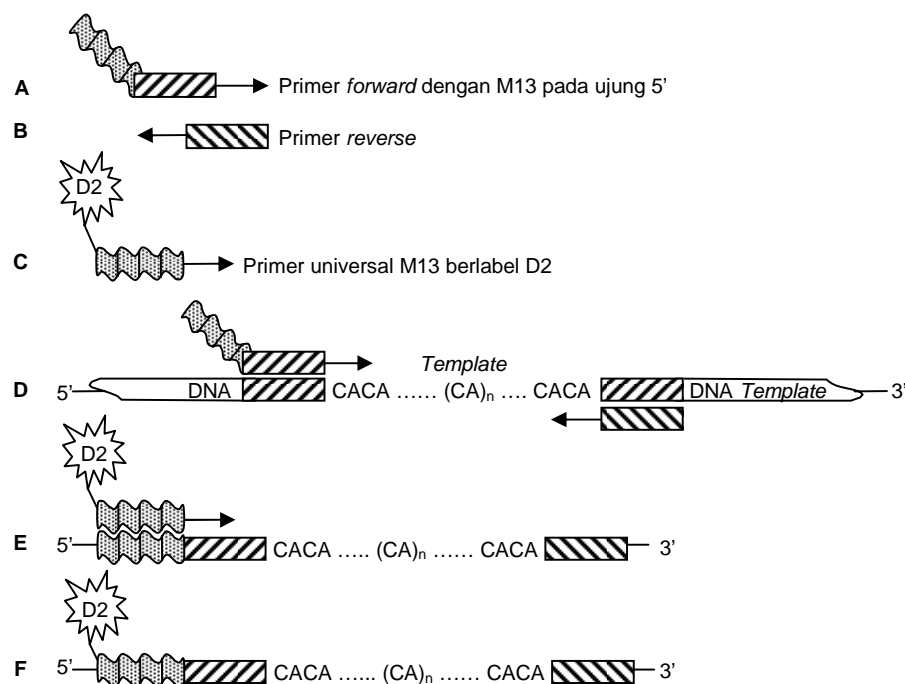
10 kelompok pautan kedelai yang belum dipilih dalam penelitian sebelumnya (Septiningsih *et al.* 2004, Santoso *et al.* 2006). Sesuai prosedur dari Schuelke (2000), primer *forward* dipesan dengan tambahan 18 pb utasan primer universal M13 pada ujung 5' (TGT AAA ACG ACG GCC AGT). Primer M13 berlabel fluoresen WellRed® D2 (hitam), hijau (D3), dan biru (D4). Semua primer dipesan dari Invitrogen™.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA padi dan kedelai dilakukan pada mesin PCR (Biometra T1) dalam campuran reaksi berturut-turut sesuai metode Laboratorium Terpadu Litbang (2006) dan Narvel *et al.* (2000) dengan modifikasi sesuai Schuelke (2000). Reaksi amplifikasi DNA padi terdiri dari 1 x bufer PCR + $MgCl_2$, dNTP 0,3 mM (In vitro-gen™), $MgCl_2$ 1 mM, primer *forward* 0,1 μ M, primer *reverse* 0,4 μ M, primer M13 berlabel fluoresen 0,4 μ M, *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche) 0,75 U, dan DNA 20 ng sedangkan untuk kedelai terdiri dari 1 x bufer PCR, dNTP 0,2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, primer *forward* 0,1 μ M, primer *reverse* 0,4 μ M, primer M13 berlabel fluoresen 0,4 μ M, *Taq Polymerase* 1 U, dan DNA 30 ng. Amplifikasi dilakukan dalam volume reaksi 20 μ M. Warna label fluoresen yang digunakan untuk tiap

mikrosatelit dipilih secara acak. Program PCR yang digunakan sesuai Schuelke (2000) sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti dengan 30 siklus tahapan yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 45 detik, perpanjangan basa pada suhu 72°C selama 45 detik, kemudian diikuti dengan 8 siklus tahapan yang terdiri dari 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 53°C selama 45 detik, perpanjangan basa pada suhu 72°C selama 45 detik, diakhiri dengan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Mekanisme amplifikasi DNA dengan sistem tiga primer ini dijelaskan pada Gambar 1.

Untuk mendapatkan kisaran ukuran alel yang terdeteksi pada *genetic analyzer* secara cepat DNA lima aksesori digabungkan hingga didapatkan konsentrasi akhir masing-masing aksesori menjadi 10 ng/ μ l kemudian diamplifikasi secara bersama-sama pada mesin PCR. Dua DNA gabungan (*pool* A dan B) dibuat untuk masing-masing komoditas padi dan kedelai. DNA yang digabungkan dipilih secara acak. DNA *pool* A padi terdiri atas Barumun, Cisadane, Memberamo, Dodokan, dan Angke sedangkan *pool* B dari Krowal, Jatiluhur, Dupa, Way Rarem, dan Fatmawati. Kecuali Krowal,



Gambar 1. Skema amplifikasi lokus mikrosatelit menggunakan primer spesifik dan primer universal M13 berlabel fluoresen. Primer *forward* yang telah ditambah dengan utasan primer M13 sepanjang 18 bp pada ujung 5' (A) diamplifikasi bersama-sama dengan primer *reverse* (B) dan primer M13 berlabel fluoresen D2 (C). Pada siklus awal PCR primer *forward* berujung M13 bergabung dengan produk PCR (D) yang kemudian menjadi target amplifikasi oleh primer M13 berlabel fluoresen pada siklus berikutnya pada suhu penempelan primer M13, yaitu 53°C (E). Produk akhir berlabel (F) dapat dianalisis pada *genetic analyzer* (Schuelke 2000).

semuanya varietas unggul nasional. DNA *pool* A kedelai berasal dari varietas introduksi (Bon Minori, CES 4-14, Columbus, GM1436 Si, dan ICA Cili) dan *pool* B dari varietas unggul nasional (Burangrang, Pangrango, Raung, Rinjani, dan Sinabung). Kisaran ukuran alel masing-masing mikrosatelit yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan *genetic analyzer* diuji pada tiga varietas padi (varietas introduksi H27 dan ARC10550, dan varietas unggul nasional Barumun) dan tiga varietas lokal kedelai (M2787, Lokal Jatim, dan Davros X 945/0/0/2) yang dipilih secara acak.

Deteksi Fragmen Mikrosatelit pada *Genetic Analyzer*

Produk PCR (2,5 μ l) diencerkan dalam SLS (*sample loading solution*, Beckman Coulter®) dengan perbandingan 1 : 6 (v/v). Dari pengenceran ini diambil volume sebanyak 1, 2, 3, dan 4 μ l berturut-turut untuk produk PCR hasil amplifikasi dengan primer berlabel D4, D3, dan D2. Ke dalam campuran sampel ditambahkan 0,5 μ l CEQ *internal size standard* 400 pb (Beckman Coulter®) dan SLS sehingga volume akhir menjadi 40 μ l. Dalam satu sumur dicampurkan produk PCR hasil amplifikasi dengan tiga primer yang masing-masing berlabel warna fluoresen berbeda. *Genetic analyzer* (Beckman Coulter CEQ8000) dijalankan sesuai petunjuk pengoperasian dari pabrik menggunakan program Frag-1 (suhu kapiler 35°C, injeksi pada 2,0 kV selama 30 detik, denaturasi pada 90°C selama 120 detik, dan separasi pada 7,5 kV selama 35 menit).

Rancangan Set Panel Multipleks Produk PCR

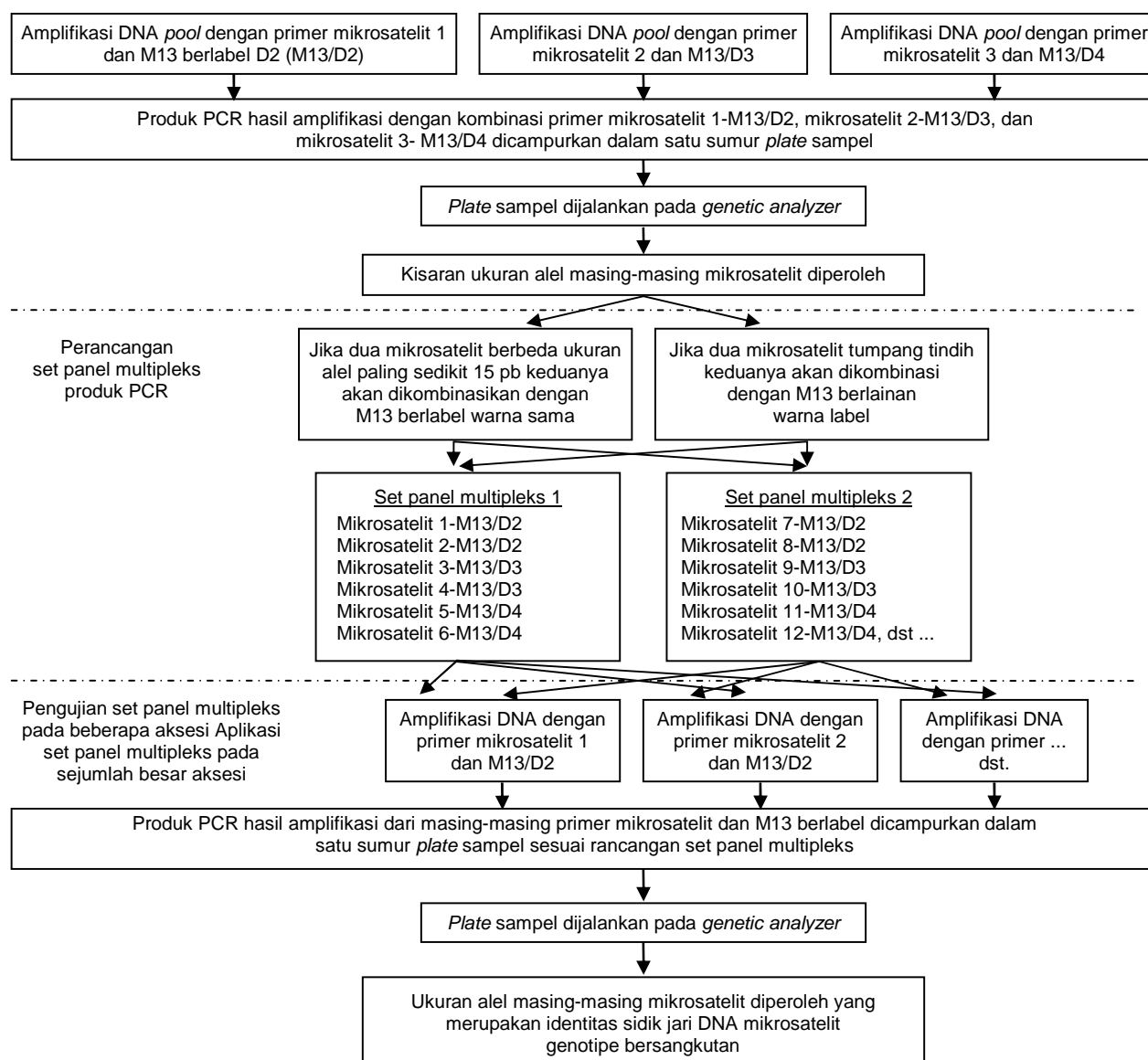
Set panel mengandung beberapa produk PCR hasil amplifikasi dengan beberapa primer mikrosatelit berbeda yang akan dijalankan dalam satu kapiler *array* dirancang berdasarkan kisaran ukuran alel mikrosatelit yang diperoleh dari hasil deteksi produk amplifikasi DNA *pool*. Aturan pelabelan sebagai berikut: lokus-lokus mikrosatelit yang berbeda ukuran alel paling sedikit 15 pb diamplifikasi dengan primer M13 berlabel dengan warna fluoresen sama sedangkan lokus-lokus yang tumpang tindih ukuran alelnya diamplifikasi dengan primer M13 berlabel warna berbeda. Set panel multipleks terdiri dari kombinasi kedua kelompok mikrosatelit tersebut. Panel-panel multipleks diuji pada satu aksesori padi (varietas unggul nasional Digul) dan kedelai (varietas lokal Bali-A) yang dipilih secara acak sebelum digunakan untuk menganalisis 50 aksesori padi dan kedelai pada penelitian lanjutan. Tahapan amplifikasi DNA hingga perancangan set panel multipleks dapat dilihat pada Gambar 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada sistem deteksi fluoresen konvensional, pelabelan salah satu dari sepasang primer spesifik merupakan tahap kritis dalam pengelompokan penanda ke dalam set multipleks. Apabila setelah kisaran ukuran alel diketahui ternyata penanda mikrosatelit sulit dikelompokkan ke dalam panel-panel maka primer mikrosatelit perlu dipesan kembali dengan label warna berbeda agar dapat dikombinasikan. Dengan metode yang dikembangkan oleh Schuelke (2000) primer mikrosatelit cukup dipesan satu kali karena label dilekatkan pada primer universal yang dapat dikombinasikan dengan primer mikrosatelit manapun. Primer mikrosatelit cukup diamplifikasi ulang bersama-sama dengan primer universal berlabel warna fluoresen lain.

Kisaran ukuran alel mikrosatelit yang dipublikasikan seringkali hanya berlaku pada set aksesori yang dipelajari sehingga penaksiran ukuran alel perlu dilakukan kembali pada beberapa sampel (Diwan dan Cregan 1997). Pada penelitian sebelumnya oleh Septiningsih *et al.* (2004) dan Santoso *et al.* (2006) penaksiran ukuran alel didasarkan pada amplifikasi DNA empat aksesori secara tunggal. Sementara itu pada penelitian ini kisaran ukuran alel diperoleh dari penggabungan dan amplifikasi DNA dari lima aksesori sekaligus. Metode ini memberikan penaksiran kisaran ukuran alel yang lebih komprehensif terutama jika plasma nutfah yang dipelajari mencakup aksesori yang sangat beragam.

Gambar 3 memperlihatkan contoh elektrofo-
regram hasil analisis *pool* DNA untuk mikrosatelit padi RM209 dan mikrosatelit kedelai Satt571. Di samping alel-alel utama yang terlihat sebagai puncak-puncak tinggi terlihat pula puncak-puncak lebih rendah yang berbeda ukuran 1-3 pb lebih kecil atau lebih besar (*stutter peaks*). *Stutter* ini diakibatkan oleh “melesetnya” amplifikasi mikrosatelit dalam PCR sehingga dihasilkan satu atau beberapa produk amplifikasi tambahan pada alel utama (Bredemeijer *et al.* 1998). Puncak-puncak *stutter* tidak menghalangi pembacaan ukuran alel kecuali apabila puncak alel utama dan puncak-puncak *stutter* tumpang tindih ukurannya pada kultivar heterosigot, yang memperlihatkan dua puncak alel utama. RM209 berukuran alel 137, 152, dan 172 pb pada DNA padi *pool* A sedangkan pada *pool* B berukuran 144, 152, dan 173 pb. Pada DNA kedelai *pool* A alel yang terdeteksi berukuran 125, 137, 147, dan 159 pb sedangkan pada *pool* B hanya ada dua alel (125 dan 146 pb). Ukuran alel RM209 dan Satt571 yang terdapat pada tiga aksesori padi dan kedelai yang diuji (Gambar 3) telah tercakup dalam kisaran ukuran alel yang terdeteksi pada DNA *pool*. Padi varietas H27 memiliki alel RM209 berukuran 151 pb, ARC 10550 ber-



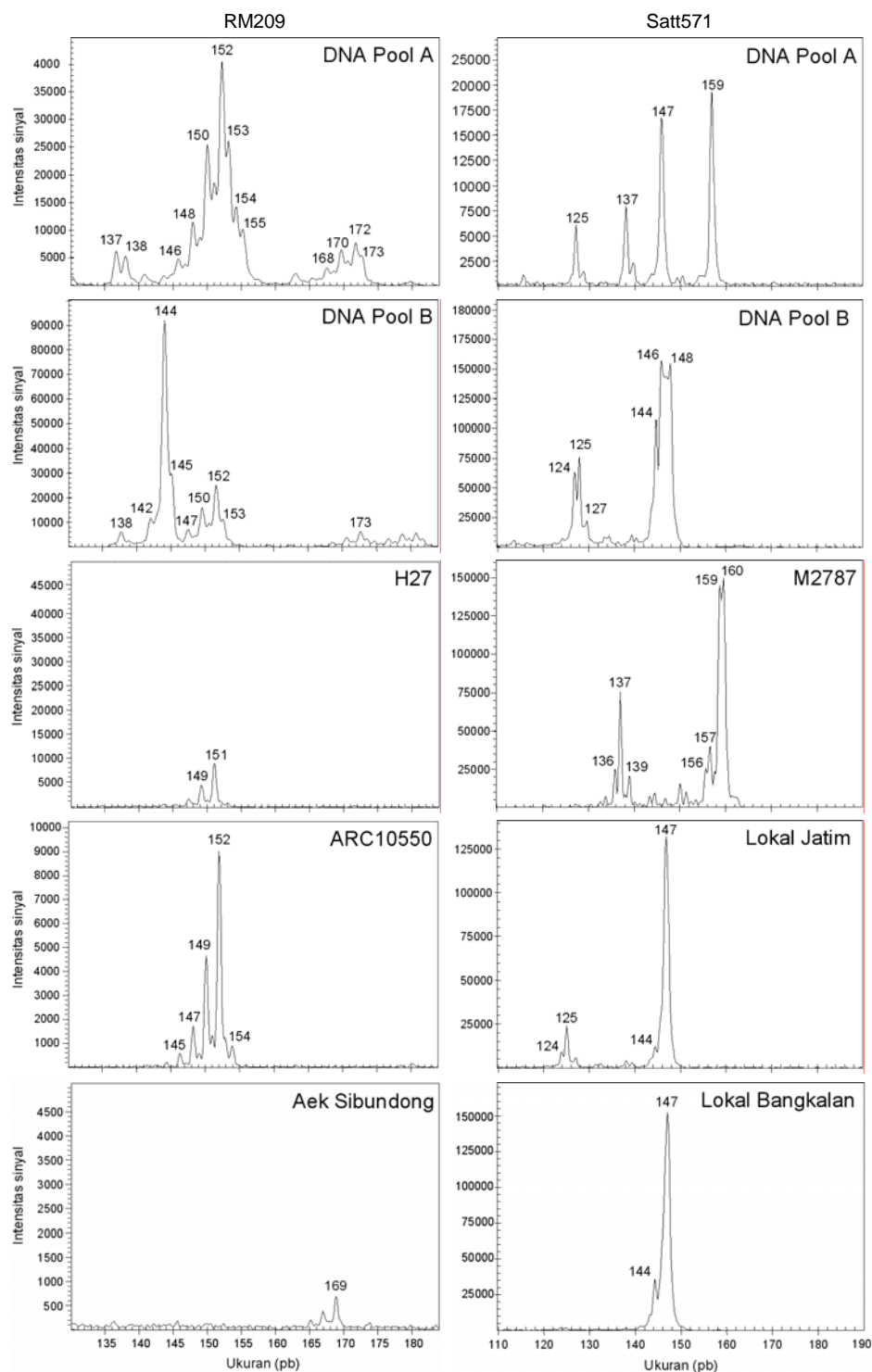
Gambar 2. Skema pengembangan set panel mutipleks produk PCR untuk dianalisis pada *genetic analyzer*.

ukuran alel 152 pb, dan Barumun 170 pb. Kedelai varietas Davros X 945/0/0/2 mempunyai satu alel Satt571 berukuran 149 pb sedangkan M2787 dan Lokal Jatim di samping mempunyai satu alel utama (berturut-turut 159 dan 147 pb), juga mempunyai satu alel berukuran lebih pendek (berturut-turut 137 dan 125 pb) dengan intensitas sinyal yang lebih rendah daripada alel utama.

Kisaran ukuran alel berdasarkan *pool* DNA dari tiap mikrosatelit tercantum pada Tabel 1. Ukuran alel terluar dijadikan batas kisaran ukuran alel dan berdasarkan kisaran ini dua panel multipleks penanda mikrosatelit padi dan tiga panel untuk kedelai telah dirancang. Panel multipleks padi masing-masing terdiri

dari tujuh dan delapan lokus penanda, sedangkan panel untuk kedelai hanya terdiri dari tiga sampai empat penanda (Tabel 1). Kisaran ukuran alel ke-10 mikrosatelit kedelai berdekatan satu sama lain dan juga tumpang tindih sehingga tidak dapat digabungkan dalam satu atau dua panel saja.

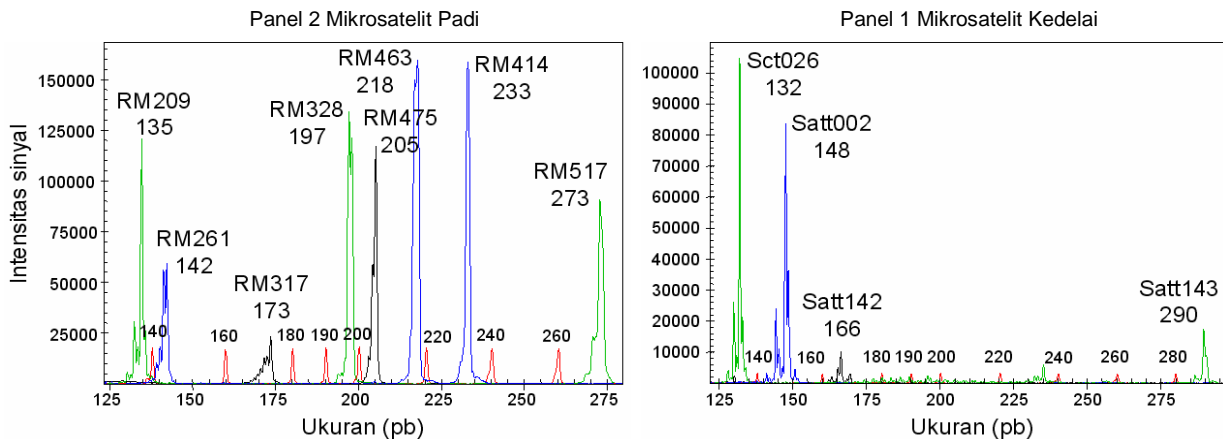
Panel-panel multipleks tersebut diuji pada padi varietas Digul dan kedelai varietas Bali-A. DNA masing-masing aksesori diamplifikasi dengan primer mikrosatelit dan primer M13 berlabel sesuai rancangan panel multipleks yang telah ditetapkan. Contoh elektroforesgram panel multipleks dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil pengujian menunjukkan bahwa alel-alel mikrosatelit-mikrosatelit tampak terpisah dengan baik dan



Gambar 3. Elektroforegram hasil analisis dengan mikrosatelit padi RM209 dan mikrosatelit kedelai Satt571.

berada dalam kisaran ukuran untuk masing-masing mikrosatelit. Namun demikian terdapat perbedaan intensitas sinyal fluoresen yang menyolok: intensitas sinyal fluoresen D3 (hijau) dan D4 (biru) tampak 6-10

kali lebih kuat daripada intensitas sinyal D2 (hitam). Kesenjangan ini dapat diperkecil dengan mengurangi volume produk amplifikasi PCR berlabel D3 dan D4 yang dicampurkan dalam satu sumur *plate* sampel.



Gambar 4. Elektroforegram dari panel 1 multipleks mikrosatelit padi dan panel 2 kedelai. Puncak-puncak berwarna merah adalah *internal size standard*.

Aplikasi panel multipleks yang telah dirancang pada penelitian selanjutnya terhadap 50 aksesori padi dan kedelai (data lengkap tidak diperlihatkan) tidak mendeteksi adanya ukuran alel yang tumpang tindih dari dua mikrosatelit berlabel warna sama dalam satu panel. Hal ini menunjukkan bahwa set panel yang dirancang sudah memadai untuk tujuan analisis keragaman genetik plasma nutfah yang dipelajari. Alel-alel tambahan di luar kisaran ukuran terdeteksi pada RM223, RM475, RM463, Satt142, Satt005, Satt263, dan Satt571. Tambahan alel ini tidak menyulitkan pembacaan penanda yang berlabel warna sama karena perbedaan ukuran alel terkecil yang terdeteksi masih sebesar 12 pb, yaitu antara RM596 dan RM111. Perbedaan ukuran terkecil hingga 9 pb masih dapat ditoleransi (Narvel *et al.* 2000). Set multipleks ini dirancang terbatas berdasarkan varietas budi daya sehingga aplikasi pada aksesori dengan genotipe lebih beragam, yang mungkin saja mengandung alel-alel berfrekuensi jarang, memerlukan pengaturan kembali kombinasi mikrosatelit dan label fluoresen dalam satu panel.

Jumlah lokus set panel multipleks mikrosatelit kedelai yang dirancang masih mungkin ditambah lagi dengan mikrosatelit yang telah digunakan oleh Santoso *et al.* (2006) agar analisis sidik jari plasma nutfah kedelai menjadi lebih efisien. Sementara itu jumlah lokus set panel multipleks mikrosatelit padi sulit ditambah lagi, kecuali utasan primer dirancang ulang agar lebih mendekati atau menjauhi inti motif pengulangan mikrosatelit sehingga ukuran produk amplifikasi tidak tumpang tindih dengan produk amplifikasi primer lainnya (Narvel *et al.* 2000).

Sistem primer M13 berlabel fluoresen dapat menghemat biaya analisis 1,1 kali dibandingkan dengan metode primer spesifik berlabel. Apabila ada 10 primer yang diuji maka terjadi penghematan sebesar

9,5 kali dan untuk 50 primer sebesar 29,5 kali. Biaya deteksi pada *genetic analyzer* dapat lebih ditekan apabila DNA diamplifikasi secara multipleks, yaitu beberapa primer mikrosatelit digunakan sekaligus dalam satu reaksi tunggal amplifikasi PCR (Narvel *et al.* 2000, Schuelke 2000).

Tiga modifikasi utama kondisi PCR di anjurkan oleh Schuelke (2000) agar primer M13 berlabel fluoresen dapat terdeteksi dengan baik: (1) konsentrasi primer universal dan primer *reverse* dalam campuran reaksi harus sama; (2) konsentrasi primer *forward* yang digunakan harus seperempat dari primer universal agar ketika primer *forward* telah habis maka primer universal dapat mengambil alih dan menempel pada produk PCR pada siklus-siklus terakhir; (3) suhu penempelan primer pada kedelapan siklus terakhir harus 53°C agar primer M13 dapat menempel pada produk PCR. Penurunan suhu penempelan primer pada siklus PCR terakhir ini tampaknya tidak terlalu penting karena pada beberapa percobaan sinyal fluoresen masih terdeteksi baik meskipun suhu tidak diturunkan hingga 53°C.

KESIMPULAN

Penggunaan primer universal berlabel fluoresen memudahkan perancangan set panel multipleks untuk deteksi fragmen mikrosatelit pada *genetic analyzer* dan dapat menghemat biaya analisis karena mudah dikombinasikan dengan primer spesifik manapun. Penggabungan DNA beberapa aksesori sekaligus telah memberikan penaksiran kisaran ukuran alel mikrosatelit yang komprehensif.

Dua panel multipleks mikrosatelit untuk padi dan tiga untuk kedelai telah dirancang. Aplikasinya pada spektrum aksesori yang lebih luas termasuk kerabat liar

masih memerlukan pengujian terlebih dahulu karena set panel ini dirancang terbatas pada beberapa kultivar nasional dan introduksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Dani Setyawan, MSc. yang telah menyarankan penggunaan primer universal; Sdr. Sujarno, Ma'sumah, dan Ahmad Syarief untuk penyiapan tanaman dan DNA; serta kepada para penelaah yang telah memberikan masukan yang berguna untuk perbaikan makalah ini. Penelitian didanai APBN 2007 nomor proyek 3209.0/018-09.0/XII/2007. 1525.0460.A5.

DAFTAR PUSTAKA

- Bredemeijer, G.M.M., P. Arens, D. Wouters, D. Visser, and B. Vosman. 1998.** The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 97:584-590.
- Diwan, N. and P.B. Cregan. 1997.** Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Laboratorium Terpadu Litbang. 2006.** Lab. Manual Protocol Standar Operating Procedure BB-Biogen. Departemen Pertanian Indonesia.
- Mitchell, S.E., S. Kresovich, C.A. Jester, C.J. Fernandez, and A.K. Scedw-McFadden. 1997.** Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Sci.* 37:617-624.
- Narvel, J.M., W. Chu, W.R. Fehr, P.B. Cregan, and R.C. Shoemaker. 2000.** Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Mol. Breed.* 6:175-183.
- Santoso, T.J., D.W. Utami, dan E.M. Septiningsih. 2006.** Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal Agrobiogen* 2(1):1-7.
- Schuelke, M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.* 18:233-234.
- Septiningsih, E.M., T.J. Santoso, D.W. Utami, dan N. Hidayatun. 2004.** Analisis sidik jari DNA varietas tanaman pangan. *Kumpulan Makalah Seminar Hasil Penelitian BB-Biogen Tahun 2004*, hlm. 140-151.
-